

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2000-189186  
(43)Date of publication of application : 11.07.2000

---

(51)Int.CI. C12P 19/26  
C08B 37/08  
//(C12P 19/26  
C12R 1:46 )

---

(21)Application number : 11-033356 (71)Applicant : DENKI KAGAKU KOGYO KK  
(22)Date of filing : 01.01.1999 (72)Inventor : MORIKAWA TADASHI  
KITAGAWA HIROYUKI

---

## (54) PRODUCTION OF HYALURONIC ACID THROUGH FERMENTATION

### (57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for producing hyaluronic acid in high yield stably in an industrial scale.

SOLUTION: In the production of hyaluronic acid by culturing a microorganism capable of producing hyaluronic acid, a gas containing 250-500 ppm of carbon dioxide is fed into the culture tank.

---

### LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 21.09.2004

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than withdrawal  
the examiner's decision of rejection or  
application converted registration]

[Date of final disposal for application] 23.05.2007

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision  
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's  
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2000-189186

(P2000-189186A)

(43)公開日 平成12年7月11日(2000.7.11)

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>

識別記号

F I

テーマコード(参考)

C 12 P 19/26

C 12 P 19/26

4 B 0 6 4

C 08 B 37/08

C 08 B 37/08

Z 4 C 0 9 0

// (C 12 P 19/26

C 12 R 1:46)

審査請求 未請求 請求項の数4 書面 (全3頁)

(21)出願番号

特願平11-33356

(71)出願人 000003296

電気化学工業株式会社

東京都千代田区有楽町1丁目4番1号

(22)出願日 平成11年1月1日(1999.1.1)

(72)発明者 守川 忠志

東京都町田市旭町3丁目5番1号 電気化  
学工業株式会社総合研究所内

(72)発明者 北川 広進

東京都町田市旭町3丁目5番1号 電気化  
学工業株式会社総合研究所内

F ターム(参考) 4B064 AF17 CA02 CC03 CC08 CC12

CD01

4C090 AA04 BA67 BC24 CA42

(54)【発明の名称】 発酵法によるヒアルロン酸の製造方法

(57)【要約】

【課題】 ヒアルロン酸を工業的にかつ安定に高収率で生産する方法を提供すること。

【解決手段】 ヒアルロン酸產生能を有する微生物の培養によりヒアルロン酸を生産するに際し、250～500 ppmの二酸化炭素を含むガスを培養槽に供給することを特徴とする発酵法によるヒアルロン酸の製造方法を構成とする。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヒアルロン酸産生能を有する微生物の培養によりヒアルロン酸を生産するに際し、250～500 ppmの二酸化炭素を含むガスを培養槽に供給することを特徴とする発酵法によるヒアルロン酸の製造方法。

【請求項2】 培養槽に供給するガスが空気であることを特徴とする請求項1記載のヒアルロン酸の製造方法。

【請求項3】 培養槽に供給するガスの通気量が、0.1～1vvmであることを特徴とする請求項2記載のヒアルロン酸の製造方法。

【請求項4】 ヒアルロン酸産生能を有する微生物がストレプトコッカス属細菌であることを特徴とする請求項1～3のいずれか1項に記載のヒアルロン酸の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、発酵法によるヒアルロン酸の製造方法に関する。更に詳しくは、250～500 ppmの二酸化炭素を含むガスを培養槽に供給しながらヒアルロン酸産生能を有する微生物を培養して、発酵法によりヒアルロン酸を得る方法に関する。

【0002】

【従来の技術】従来、ヒアルロン酸はニワトリのトサカや牛の眼の硝子体等より抽出によって得られていた。しかしながら抽出法による生体からのヒアルロン酸製造においては、多量のヒアルロン酸に類似したムコ多糖類や蛋白質等の夾雑物との煩雑な分離が必要であり、また、組織内に含まれるヒアルロニダーゼ等による低分子化等の問題点を有しているため、高収量で高純度かつ高分子量のヒアルロン酸を得ることは不可能である。その問題点を改良するために、ヒアルロン酸産生能を有する微生物であるストレプトコッカス属の微生物を培養して、その培養液からヒアルロン酸を分離、精製する方法が開示されている（特公平4-12960号）。

【0003】さらに、ヒアルロン酸生産性の安定化及び生産収率の向上を目的として、変異株を利用する方法（特公平4-39998号、特公平4-43637号、特公平4-55675号）、有効成分を添加する方法（特開昭62-289198号、特開平4-18839号）等が開示されている。

【0004】培養槽に供給するガスに関しては、生産収率の向上を目的として、二酸化炭素強増嫌気性条件下で培養する方法（特公平4-64679号）、通気搅拌のコントロールにより酸化還元電位を制御しながら培養する方法（特開昭62-51999号）、指数増殖点まで好気性条件下で培養しその後低い溶存酸素濃度で培養する方法（特開平3-35788号）等が開示されている。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】発酵法によるヒアルロ

ン酸生産における微生物の培養工程においては、一般的に、培養槽に空気等のガスを供給しながら培養を行う。しかし、好気培養において培養槽に供給するガス中の二酸化炭素濃度が培養に及ぼす影響については知られていない。

【0006】本発明者らはこの課題を解決すべく、好気培養における培養槽に供給するガス中の二酸化炭素濃度について、ヒアルロン酸生産菌の生育及びヒアルロン酸生産性を指標に検討した結果、二酸化炭素濃度が250～500 ppmのガスを供給しながらヒアルロン酸産生能を有する微生物を培養することにより高収率でヒアルロン酸を生産することが可能であることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0007】

【課題を解決するための手段】すなわち、本発明は、（1）ヒアルロン酸産生能を有する微生物の培養によりヒアルロン酸を生産するに際し、250～500 ppmの二酸化炭素を含むガスを培養槽に供給することを特徴とする発酵法によるヒアルロン酸の製造方法、（2）培養槽に供給するガスが空気であることを特徴とする（1）記載のヒアルロン酸の製造方法、（3）培養槽に供給するガスの通気量が、0.1～1vvmであることを特徴とする（2）記載のヒアルロン酸の製造方法、（4）ヒアルロン酸産生能を有する微生物がストレプトコッカス属細菌であることを特徴とする（1）～（3）のいずれかに記載のヒアルロン酸の製造方法である。

【0008】

【発明の実施の形態】以下、本発明について具体的に説明する。本発明に用いられる微生物としては、ストレプトコッカス・エキ（*Streptococcus equi*）、ストレプトコッカス・ズーエピデミカス（*Streptococcus zoopidemicus*）、ストレプトコッカス・エキシミリス（*Streptococcus equisimilis*）、ストレプトコッカス・ディスガラクティエ（*Streptococcus dysgalactiae*）、ストレプトコッカス・ピオゲネス（*Streptococcus pyogenes*）およびこれらの変異株などが挙げられるが、なかでもストレプトコッカス・エキが好ましく、特にストレプトコッカス・エキの変異株FM-100（微工研条寄第9027号）又はストレプトコッカス・エキの変異株FM-300（微工研条寄第2319号）が好ましい。

【0009】本発明に用いる培地はグルコース、フラクトース、ガラクトース、シュークロース等の糖成分からなる炭素源、リン酸第1カリウム、リン酸第2カリウム、硝酸マグネシウム、亜硫酸ナトリウム、チオ硫酸ナトリウム、リン酸アンモニウム等の無機塩類、ポリペプトン、カザミノ酸、酵母エキス、コーンスティーピリカー、大豆加水分解液等の有機栄養源、他必要に応じて各

種ビタミン類等が好適に用いられる。

【0010】本発明の培養は、培養槽に供給されるガスを培地にバーリングしながら行い、攪拌等は公知の方法を用いることができる。使用するガスとしては、空気を用いることが好ましいが、酸素、窒素、二酸化炭素、空気等を混合して用いることも可能である。使用するガスの無菌化は公知の方法を用いて行い、その他必要に応じて除湿等の前処理を行ってもよい。いずれにせよ、最終的に培養槽に供給するガス中の二酸化炭素濃度が250～500 ppmであることが必要である。二酸化炭素濃度が250 ppmより低いと、ヒアルロン酸生産菌の増殖が遅くなるため工業的な生産を行う際に大きな障害となる。また、二酸化炭素濃度が500 ppmより高いガスを供給することは、設備及び供給ガスコスト増大をまねき、実用上現実的ではない。通気量は、特に制限は無いが、0.1～1 vvm程度が好ましい。

【0011】培養温度は30～35℃が好ましい。培養液のpHは菌の生育と共に低下するため、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、アンモニア等のpH調整剤を添加し pH 6.0～9.0にコントロールする。このようにして培養すると、ヒアルロン酸の生成と共に培養液の粘度が次第に上昇してくる。任意の時点で培養を停止し、除菌後、アルコール等の有機溶剤による析出、限外済過による脱塩等の公知精製法により高純度ヒアルロン酸を得ることができる。

#### 【0012】

##### {二酸化炭素濃度分析用ガスクロマトグラフィー条件}

|            |                    |
|------------|--------------------|
| カラム        | : WG-100           |
| キャリアーガス    | : ヘリウム (50 ml/min) |
| インジェクション温度 | : 60℃              |
| オープン温度     | : 50℃              |
| 検出         | : TCD (60℃)        |
| サンプルガス注入量  | : 500 μl           |

#### 【0014】実施例2

窒素80%と酸素20%の混合物に二酸化炭素を500 ppmになるよう混合したガスを培養槽に供給した以外は、実施例1と同じ条件で培養及びヒアルロン酸の精製を行った。培養液の660 nmにおける吸光度を測定した結果、8.1であった。また、精製ヒアルロン酸の重量を測定した結果、培養液1リットルあたり6.8 gであった。

#### 【0015】比較例1

窒素80%と酸素20%の混合ガスを培養槽に供給した以外は、実施例1と同じ条件で培養を行ったところ、接種菌はまったく増殖しなかった。

【実施例】以下、本発明を実施例及び比較例により更に具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されない。

#### 実施例1

グルコース5%、リン酸第1カリウム0.2%、ポリペプトン1.0%、酵母エキス0.5%からなる培地1リットルを加熱殺菌後、ストレプトコッカス・エキ FM-100（微研条寄第9027号）を接種し、空気を1vvmで通気しながら、攪拌200回転/分、温度33℃、pH 8.5 (20%水酸化ナトリウムの自動滴下によるコントロール)で20時間培養した。培養槽に供給した空気中の二酸化炭素濃度を、ガスクロマトグラフィーを用いて下記に示す二酸化炭素濃度分析用ガスクロマトグラフィー条件で測定したところ、385 ppmであった。培養液の660 nmにおける吸光度（菌体の生育度の指標）を測定した結果、7.9であった。また、培養液1リットルを塩酸でpH 4に調整後、蒸留水で2倍希釈し、活性炭を加え、済過により除菌した。得られた除菌液にエチルアルコールを加え、析出物を済過により得た。これを水に溶解し、セチルピリジニウムクロライドを加え、生じた沈殿を済取し、2%食塩水に再溶解後、エチルアルコールによる析出を2回繰り返した。この白色析出物を室温で減圧乾燥して得られた精製ヒアルロン酸ナトリウムの重量（ヒアルロン酸生産性の指標）を測定した結果、7.1 gであった。

#### 【0013】

#### 【0016】比較例2

窒素80%と酸素20%の混合物に二酸化炭素を200 ppmになるよう混合したガスを培養槽に供給した以外は、実施例1と同じ条件で培養及びヒアルロン酸の精製を行った。培養液の660 nmにおける吸光度を測定した結果、1.9であった。また、精製ヒアルロン酸の重量を測定した結果、培養液1リットルあたり0.3 gであった。

#### 【0017】

【発明の効果】本発明によれば、ヒアルロン酸を安定に高収率で生産することができるので、ヒアルロン酸の工業的な製造方法として有用である。